

## かび臭物質産生ラン藻類 *Anabaena macrospora*, *Phormidium tenue*, *Oscillatoria tenuis* 及び *Oscillatoria brevis* の鉄吸収

中島 進・青山 勲・八木 正一\*

### 緒 言

近年、琵琶湖の南湖をはじめ、霞ヶ浦や相模湖など多くの湖沼や水道水源池において、人間活動に付随する富栄養化が問題となり、ラン藻類、特にかび臭物質を産生するラン藻の発生が憂慮されている<sup>1,4,14,16-20</sup>。琵琶湖を水源とする大津、京都、大阪、神戸など関西の各都市の水道では、同湖で毎年発生するラン藻、すなわち *Anabaena macrospora* {ジオスミン (geosmin) を産生} や *Phormidium tenue*, *Oscillatoria tenuis* {2-メチルイソボルネオール (2-methylisoborneol, MIB) を産生} などが作り出すこれらのかび臭物質 (ジオスミンまたは MIB) による水道水の異臭味が大きな問題となっている。こうした水圏環境における異臭味は世界各地でも問題となり、近年この問題に関する国際シンポジウム (International Symposium on Off-Flavors in the Aquatic Environment) が開かれるようになり、1982年6月には第1回 (ヘルシンキ)、1987年10月には第2回 (鹿児島)、そして1991年3月には第3回 (ロサンゼルス) のシンポジウムがそれぞれ開催された。しかしこうしたラン藻が異常増殖する要因はまだ明らかではない。そのためかび臭物質を産生するラン藻類の発生を予測あるいは抑制する情報に関する研究は強い要請があるにもかかわらずあまり進展をみていない。

実際の湖沼生態系においてはこれらのラン藻類の増殖量は水温、光、窒素やリンの栄養塩、微量金属、有機物、酸素、藻類やバクテリアなどとの間の競合などの環境条件により支配されると考えられる。こうした条件の中で、ラン藻の生育に必須な微量元素である鉄 (III) イオンはその低い溶解性のため、中性付近の pH の通常の水圏環境下では、難溶性の水和酸化鉄 (III) のコロイド状態となる。そのためラン藻は鉄を摂取しにくくなる。

著者らはこれまで琵琶湖産の *A. macrospora*, *P. tenue* や *O. tenuis* の増殖とかび臭物質の産生に及ぼす微量金属の影響について検討を行ってきた<sup>7-13</sup>。その過程において、琵琶湖で発生しているこれらのラン藻類が湖水中の鉄をいかに利用できるかがラン藻の増殖のための重要なかぎになることを明らかにしてきた。そしてこれらのラン藻の鉄吸収機構を

平成4年1月10日受理

\*現枚方市水道局

本研究の結果の一部は第28回日本水処理生物学会 (1991年11月、於神戸市) において発表した。また本研究の一部は財団法人日本生命財団・平成2年度研究助成「ラン藻類の増殖とかび臭物質産生に及ぼす環境要因の影響に関する研究」によって行なわれた。

理解することがラン藻の増殖機構を解明する上に重要であることがわかってきた。そこで著者らは琵琶湖から単離された *O. tenuis*, *A. macrospora*, *P. tenue* 及びノルウエー産の *Oscillatoria brevis* を用いて鉄の吸収機構を検討してきた<sup>9-13)</sup>。その結果、用いた CT 培地中に EDTA が存在しない場合には、*O. tenuis*, *A. macrospora* 及び *P. tenue* の琵琶湖産の3種のラン藻は増殖阻害を起こしたが、*O. brevis* は EDTA を加えなくても増殖することができる、すなわちコロイド状態の鉄を溶解させ、吸収することができることを明らかにした。また Fe (II) と安定なキレートを形成するバソフェナントロリン (Bathophenanthroline disulfonate, BPDS) を添加した CT 培地中では、Fe(III)-EDTA 中の鉄は光照射下で2価に還元され、BPDS と反応して、Fe(II)-BPDS キレート {Fe<sup>II</sup>(BPDS)<sub>3</sub>} を生成するため、*A. macrospora* や *O. tenuis* は鉄を吸収できず、増殖阻害を起こした。しかし *O. brevis* と *P. tenue* は阻害を起こさず、増殖することができた。さらに *O. brevis* は Fe(III)-EDTA の代わりに放線菌の *Streptomyces pilosus* が産生する微生物シデロフォア (鉄運搬体, Siderophore) であるデスフェリオキサミン B (Desferrioxamine B, DESF) の Fe(III) キレートを用いても増殖できるが、他の3種のラン藻 *O. tenuis*, *A. macrospora*, *P. tenue* はこのキレートの鉄を鉄源として利用できず増殖阻害を起こした。

以上に述べたように藻類種により利用できる鉄の形態が幾分異なること、また同一のラン藻でも鉄の形態により鉄吸収機構が異なることを明らかにしてきた。

本研究では、上記4種のラン藻を用いて、培地に EDTA などのキレート剤が存在しない場合を中心に、さらに鉄吸収機構を検討し、興味ある知見を得たので、その結果を報告する。

本実験に用いた *O. brevis* は Norwegian Institute for Water Research より分与されたノルウエー産のものであり、また *O. tenuis* は大阪府水道部水質試験所より、*A. macrospora* と *P. tenue* は大阪市水道局水質試験所より、それぞれ分与されたものであり、ここに感謝します。

## 材料及び方法

供試藻類の *O. brevis* はノルウエーの Norwegian Institute for Water Research から分与されたもの<sup>6)</sup>を用いた。また *O. tenuis* は大阪府水道部水質試験所が、*A. macrospora* と *P. tenue* は大阪市水道局水質試験所がかび臭物質産生の原因藻類として琵琶湖からそれぞれ単離したものを用いた。

培地には基本培地として CT 培地<sup>15)</sup>を用いた。200ml 容の三角フラスコに培地を150ml ずつ入れ、テフロン製の多孔質膜で口を封じて、オートクレーブ滅菌(121℃, 15分)を行った。この培地にクリーンベンチの中で各ラン藻をあらかじめ培養させた培養液を200μl ずつ接種し、26℃, 2,000 lux (*O. brevis* に関する実験は1,000 lux) (16時間明, 8時間暗)で静置培養(1日1回攪拌)した。藻体の増殖量は培養液の吸光度(660nm)を島津製作所製分光光度計、スペクトロニック20で測定した。また Fe(II)-BPDS 及び Fe(III)-DESF の両キレートの生成は島津製作所製自記分光光度計 UV-240型により測定した。

## 結 果

## 1. 光照射下での Fe(III)(EDTA キレート) の Fe(II) への還元及び Fe(III) への再酸化

これまでの結果<sup>9-13)</sup> から、ラン藻の培養実験に広く用いられている CT 培地に添加されているキレート剤 EDTA は、鉄をキレートとして溶存態に保ち、藻類の生育に必須な鉄の吸収性を高めることにより、増殖を促進する作用を有していることを明らかにした。

CT 培地に添加されている Fe(III)-EDTA の光照射下での挙動について検討した。Fe(III)-EDTA を含む CT 培地に、2 価鉄と安定なキレートを生成する BPDS、あるいは 3 価鉄と安定なキレートを生成する DESF を添加して、光照射の影響を調べた。

Fe(III)-EDTA を含む培地に BPDS を添加しておく、光照射により Fe(II)-BPDS キレートを生成する。このことは培地中で以下の反応が起きていることを示唆している。光を照射すると Fe(III)-EDTA 中の鉄は 2 価に還元される (式(i))。生じた Fe(II)-EDTA は不安定であり、BPDS を添加しておく、より安定な BPDS とのキレート {Fe<sup>II</sup>(BPDS)<sub>3</sub>} (吸収極大波長535nm) を形成する (式(ii))。光を照射しない場合には鉄は 2 価に還元されない、Fe(II)-BPDS キレートの生成率は低い。こうして Fe(III)-EDTA 中の鉄は、光照射下で 2 価に還元されることがわかる<sup>3,9,13)</sup>。

(i) Fe(III)-EDTA + 光 → Fe(II)-EDTA + EDTA の分解生成物

(ii) Fe(II)-EDTA + BPDS → Fe(II)-BPDS + EDTA

次に Fe(III)-EDTA を含む培地に BPDS の代わりに DESF を添加して、光照射下での Fe(III)-DESF キレートの生成 (吸収極大波長425nm) を検討した。その結果を Fig. 1 に示す。図から明らかなように、光照射することにより Fe(III)-DESF キレートの生成が促進される。一方、光を照射しなければ同キレートの生成速度は遅い。このことは Fe(III)-EDTA から Fe(III)-DESF のキレートへの変換が光照射により促進されることを示している。すなわち光照射下で Fe(III)-EDTA は Fe(II)-EDTA に還元された後、水中の溶存酸素により鉄は再び 3 価に酸化されるが、鉄は安定度のより高い Fe(III)-DESF キレートを生成することがわかる {安定度定数: Fe(II)-EDTA, 14 ; Fe(III)-EDTA, 25 ; Fe(II)-DESF, ~10<sup>50</sup> ; Fe(III)-DESF, 31<sup>50</sup>}。

こうして Fe(III)-EDTA 中の鉄は培地中で Fe(III) → Fe(II) → Fe(III) を繰り返していることが考えられ、EDTA は徐々に分解し、そして鉄は少しずつコロイド状態の鉄に変わっていくことが推測される。

## 2. コロイド鉄の添加量が 4 種のラン藻類の鉄吸収に及ぼす影響

かび臭物質産生ラン藻類 4 種の増殖に関する著者らのこれまでの実験結果<sup>9-13)</sup> から、1 μM レベルの鉄を含む培地に EDTA を添加しないと、*O. tenuis*, *A. macrospora*, *P. tenue* の 3 種は鉄を吸収できず増殖がきわめて劣ること<sup>9,10)</sup>、一方 *O. brevis* は EDTA を添加しなくても、すなわち鉄がコロイド状態で存在していても鉄を吸収し増殖可能であることが明らかになった<sup>11-13)</sup>。

本研究ではコロイド鉄の添加量を多くして、琵琶湖産の *A. macrospora*, *P. tenue*, *O.*

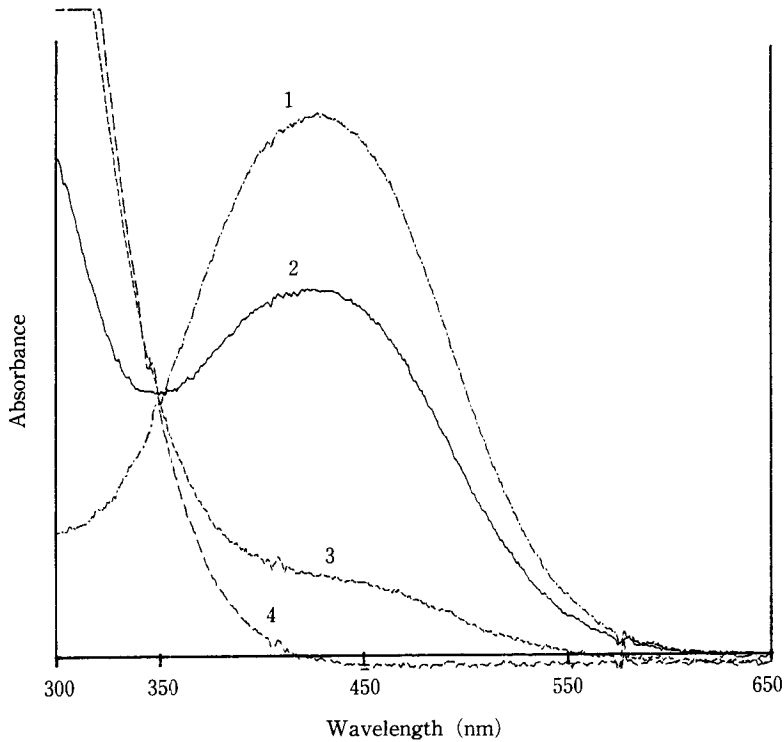


Fig. 1. Effect of light on the conversion of Fe(III)-EDTA to Fe(III)-DESF (Desferrioxamine B).

Illumination at 2,000 lux for 16:8 hours (light:dark).

- 1: Fe(III)-DESF; 2: Fe(III)-EDTA + DESF (light, 2nd day after mixing); 3: Fe(III)-EDTA + DESF (dark, 2nd day after mixing); 4: Fe(III)-EDTA + DESF (immediately after mixing).

*tenuis* の増殖を検討すると共に、オートクレーブ処理をして安定化したコロイド鉄が上記3種のラン藻の増殖に及ぼす影響を検討した。

*A. macrospora*, *P. tenue*, *O. tenuis* の増殖に及ぼすコロイド鉄（調製後、冷蔵庫内に保存したもの）の添加量の影響を検討した結果を Fig. 2 に示す。 *A. macrospora* の場合には、Fig. 2-A から明らかなようにコロイド鉄を Fe として  $1\mu\text{M}$  レベル添加した場合には増殖阻害が認められたが、鉄の添加量を増すと共に増殖量も増し、Fe を  $18\mu\text{M}$  添加した場合には、Fe-EDTA を含む対照の場合の約50%の増殖を示した。 *P. tenue* の場合には Fig. 2-B に示すように、 *A. macrospora* の場合より若干増殖は劣るものの、コロイド鉄の添加量を増すにつれて増殖が進むことが認められた。一方 *O. tenuis* の場合には Fig. 2-C に示すようにコロイド鉄の添加量を増しても、 *O. tenuis* は鉄を吸収できないため、 *A. macrospora* や *P. tenue* の場合とは異なり、著しい増殖阻害を起こした。したがって *O. tenuis* が鉄を効率よく吸収するためにはキレート化し、しかも光により2価に還元さ

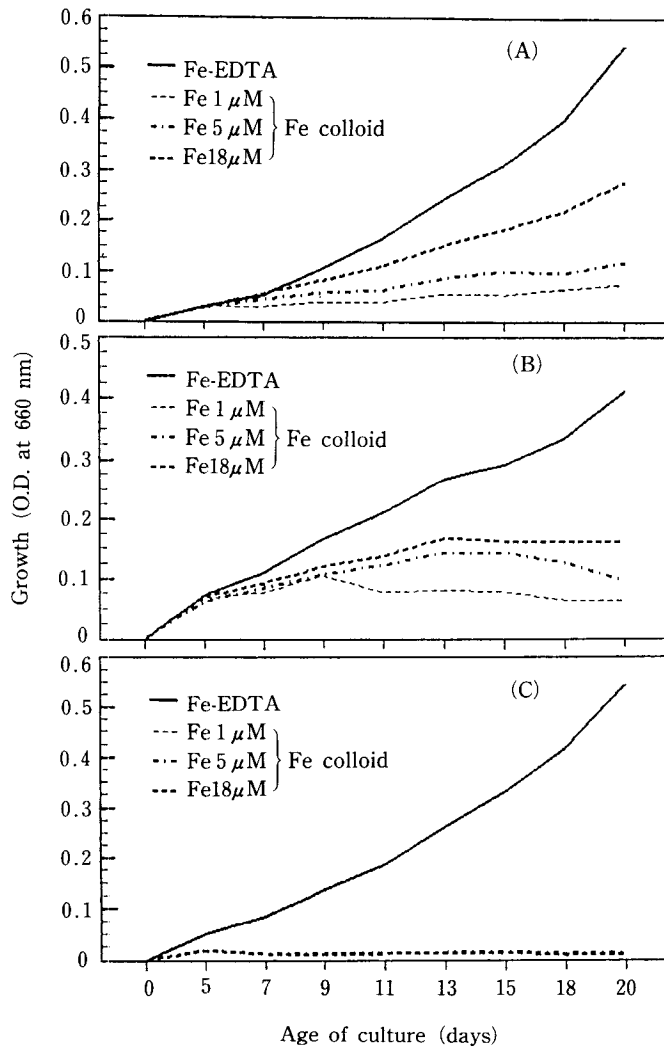


Fig. 2. Effect of amount of colloidal iron (not autoclaved) as iron source on the growth of *A. macrospora* (A), *P. tenue* (B) and *O. tenuis* (C).

れる有機態鉄を必要とすることが判明した。

次にコロイド鉄を鉄源として CT 培地に添加し、オートクレーブ処理をしたものを用いて、上記の琵琶湖産の3種のラン藻の培養実験を行った。結果をFig. 3に示す。*A. macrospora* (Fig.3-A), *P. tenue* (Fig. 3-B), *O. tenuis* はコロイド鉄を Fe として18 μMまで添加してもいずれも増殖阻害を起こした。これらのラン藻は熱処理して安定な状態に変化したコロイド鉄を利用できないために増殖ができないことが判明した。なお、*O. brevis* については既に報告<sup>11-13)</sup>したように、コロイド鉄を用いてもよく増殖できた。

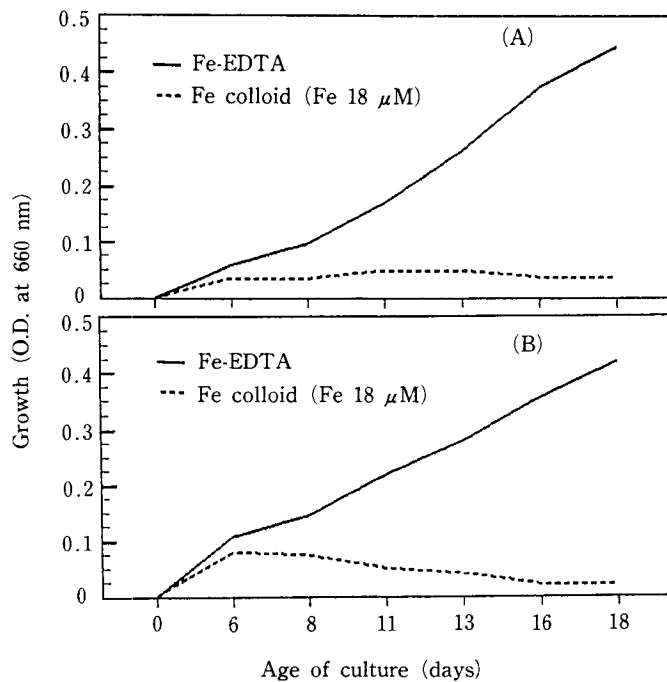


Fig. 3. Effect of amount of autoclaved colloidal iron as iron source on the growth of *A. macrospora* (A) and *P. tenue* (B).

### 3. コロイド鉄とバソフェナントロリン (BPDS) の反応

前報<sup>9)</sup>において、Fe(II)と安定なキレートを形成するバソフェナントロリン (BPDS)を培地に添加することにより培地中では Fe(III)-EDTA 中の鉄は光照射のもとで2価に還元されることを明らかにした。そして還元された Fe(II) がラン藻にとって吸収しやすい鉄の化学形態であることを示した。そこで上記の実験に用いたコロイド鉄と BPDS の反応性について検討する。培地にコロイド鉄の量を変えて添加し BPDS を加えた後、光照射下で Fe(II) と BPDS のキレートの生成量を、吸収極大波長535nmにおける吸光度を測定して検討した。コロイド鉄をオートクレーブ処理をした場合としない場合の比較結果をFig. 4に示す。Fig. 4-A から明らかなように、オートクレーブ処理をしていないコロイド鉄の場合には鉄量を増すと Fe(II)-BPDS のキレート生成量が増えること、すなわち光照射のもとで、還元される2価鉄の量が多く存在することを示している。一方、オートクレーブ処理をしたコロイド鉄の場合は Fig. 4-B に示すように、光照射のもとで2価に還元される鉄量は著しく減少し、熱処理によりコロイド鉄が安定な状態に変化したことを示している。コロイド鉄を用いたラン藻の培養実験と、BPDS を用いた2価鉄生成反応の実験の両結果を併せて考察すると以下のことが示唆される。すなわち調製直後あるいは冷蔵庫に保存したコロイド鉄溶液の場合には光照射下で2価に還元される鉄量が、熱処理したコロイド鉄溶液の場合よりも多く存在するため、コロイド鉄の添加量を多くすると、還元される2価鉄の量が増して、*A. macrospora* と *P. tenue* はその鉄を利用することができて (キレート剤 EDTA が存在しなくても) 増殖するが、*O. tenuis* の場合には利用

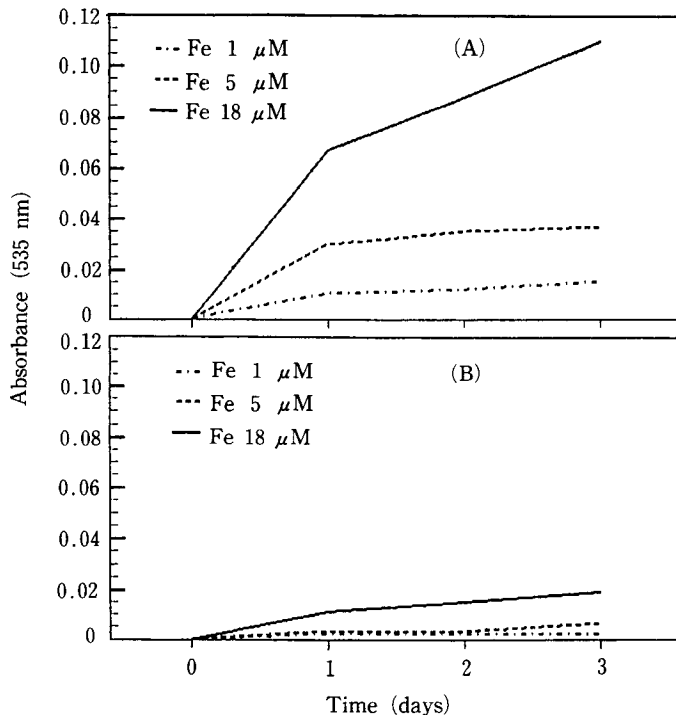


Fig. 4. Photoreduction of Fe added as colloidal iron (A: not autoclaved; B: autoclaved).

しにくい状態を起す。

一方、コロイド鉄をオートクレーブ処理すると、光照射のもとで還元される2価鉄量は著しく減少し、きわめて安定な状態に変化する。そのため琵琶湖産の3種のラン藻は鉄を吸収できなくなって、著しい増殖阻害を起こしたものと考えられる。

前報<sup>9,10)</sup>において、ラン藻類が鉄を吸収するためには、鉄が Fe(III)-EDTA キレートのような形で水中で溶けていることが必要であることを述べた。しかし Fe(III)-DESF キレートのように溶存態の形で存在していても、Fe(II)に光還元されない安定なキレートの場合には琵琶湖産の *A. macrospora*, *P. tenue* 及び *O. tenuis* は鉄を吸収できない<sup>11-13)</sup>ことを示した。このように、単に鉄が水中に溶けているだけでは、全てのラン藻が鉄を利用できるわけではなく、上記の3種のラン藻の場合には Fe(III) が光によって Fe(II) に還元されることが必要である。

今回の実験結果から、ラン藻が利用できる形態の鉄は光照射のもとで2価に還元される鉄であること、*A. macrospora* 及び *P. tenue* はそのような鉄があればキレート剤が存在しなくても鉄を吸収して増殖できること、しかし *O. tenuis* はキレート結合してしかも光照射下で2価に還元される形態の鉄が存在しない場合には、上記2種のラン藻に比べて鉄を吸収しにくいことが判明した。したがって藻類種により鉄吸収の機能において差異があることがわかる。

#### 4. 鉄源としてスポンジ鉄及び鉄粉を用いてのラン藻の培養実験

上記の結果からかび臭物質産生ラン藻類（特に *A. macrospora*, *P. tenue*, *O. brevis*）では光照射のもとで2価に還元される鉄が存在すれば（その量に依存するが）キレート剤が存在しなくても、鉄を吸収できる可能性を認めた。そこで Fe(II) を連続的に培地中に供給できるシステムとして、スポンジ鉄及び鉄粉を鉄源として培地に添加する方法を用いて、4種のラン藻の培養実験を行った。なお著者の知る限りでは、こうしたラン藻をはじめとする藻類の実験において、鉄源として粉状鉄を用いて培養実験を行った報告はみられないが、以下に述べるように鉄の吸収機構や吸収形態を研究するための鉄源として有用であることが示唆された。スポンジ鉄（オートクレーブ処理）を鉄源として用い、*A. macrospora*, *P. tenue*, *O. tenuis*, *O. brevis* を培養した結果を Fig. 5 に示す。*A. macrospora*, *P. tenue* 及び *O. brevis* はスポンジ鉄として添加した鉄源を利用して増殖できるのに対し、*O. tenuis* は利用できにくいことが判明した。スポンジ鉄はオートクレーブ処理をした方がしない場合に比べ、Fe(II)-BPDS キレート の生成量が多くなる、すなわちスポンジ鉄は熱処理により活性化され、生成する2価鉄の量が多くなった。

鉄粉を鉄源として用いたラン藻の培養実験の結果を Fig. 6 に示す。スポンジ鉄の場合と同様に *A. macrospora*, *P. tenue* 及び *O. brevis* は増殖するが、*O. tenuis* の増殖は著しく抑制された。鉄粉の場合は BPDS を添加して生じる Fe(II)-BPDS キレートはオートクレーブ処理をしてもしなくても、いずれの場合にもよく生成した（鉄粉の場合 Fe(II) 放出量が多いため光照射は必ずしも必要ではなかった）、なおスポンジ鉄及び鉄粉を鉄源として *O. tenuis* を培養する場合、EDTA や NTA（ニトリロ三酢酸）のようなキレート剤を添加すると、*O. tenuis* は鉄を効率よく利用できるため、きわめてよい増殖傾向を示した。*O. tenuis* を培養する際、鉄源としてスポンジ鉄（オートクレーブ処理をした場合及びしない場合）を用い、EDTA を添加してその影響をみた結果を Fig. 7 に示す。図か

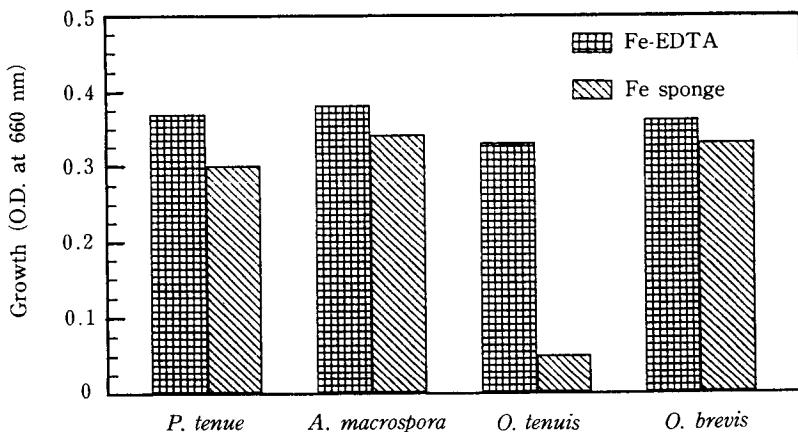


Fig. 5. Effect of spongy iron (50 mg, autoclaved, EDTA free) as iron source on the growth of musty-odor producing cyanobacteria (16th day of culture for *P. tenue*, *A. macrospora* and *O. tenuis*; 30th day of culture for *O. brevis*).



ら明らかなように *O. tenuis* の鉄吸収には EDTA の添加がきわめて効果的であることがわかる。

## 5. ラン藻の細胞による Fe(III) の Fe(II) への還元

これまでの結果から、CT 培地中の Fe(III)-EDTA 中の鉄は暗所では還元されないが、

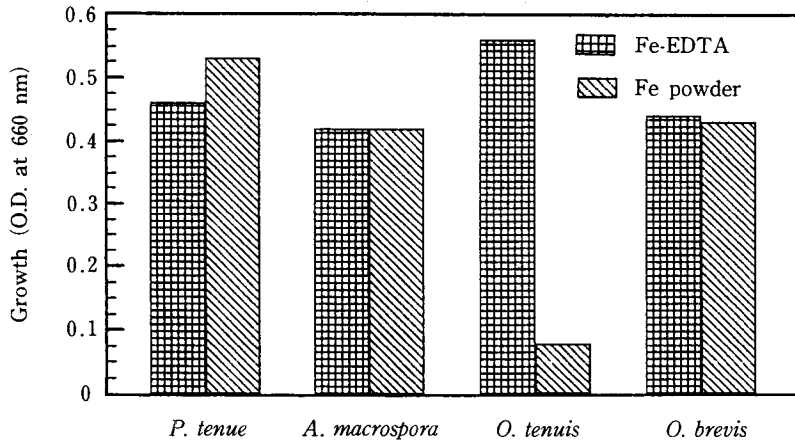


Fig. 6. Effect of powdery iron (20 mg, EDTA free) as iron source on the growth of musty-odor producing cyanobacteria (18th day of culture for *P. tenue*, *A. macrospora* and *O. tenuis*; 30th day of culture for *O. brevis*).

光照射のもとで Fe(II) に還元されること、そして琵琶湖産の3種のラン藻が水中の鉄を効率よく吸収するためには、鉄はキレート化合物として溶存態の形で存在し、しかも2価の状態に還元されることが必要であることが明らかになった。

そこで、Fe(III)-EDTA を含む CT 培地に上記4種のラン藻をそれぞれ含む培養液を加えて Fe(III) の Fe(II) への還元を検討した。*P. tenue* の細胞を含む培養液を添加して実験した結果を Fig. 8 に示す。図から明らかなように、*P. tenue* を含む培養液を加えると、加えない時に比べ、光照射のもとでの Fe(II) への還元が促進され、そして暗所においてもラン藻を含む培養液を添加することにより、Fe(II) への還元が認められた。しかしこの傾向は *P. tenue* の培養液をろ過したものを添加した場合にはその傾向が弱いことが判明した。この還元作用は *P. tenue* と *O. brevis* において比較的大きい傾向が認められた。また *P. tenue* を含む培養液を凍結後、再溶解した培養液を加えた場合にも Fe(III) はよく還元されたが、*P. tenue* を含む培養液をオートクレーブで加熱処理したものをを用いた場合には還元作用はきわめて弱かった。現在、こうしたラン藻の細胞による Fe(III) の

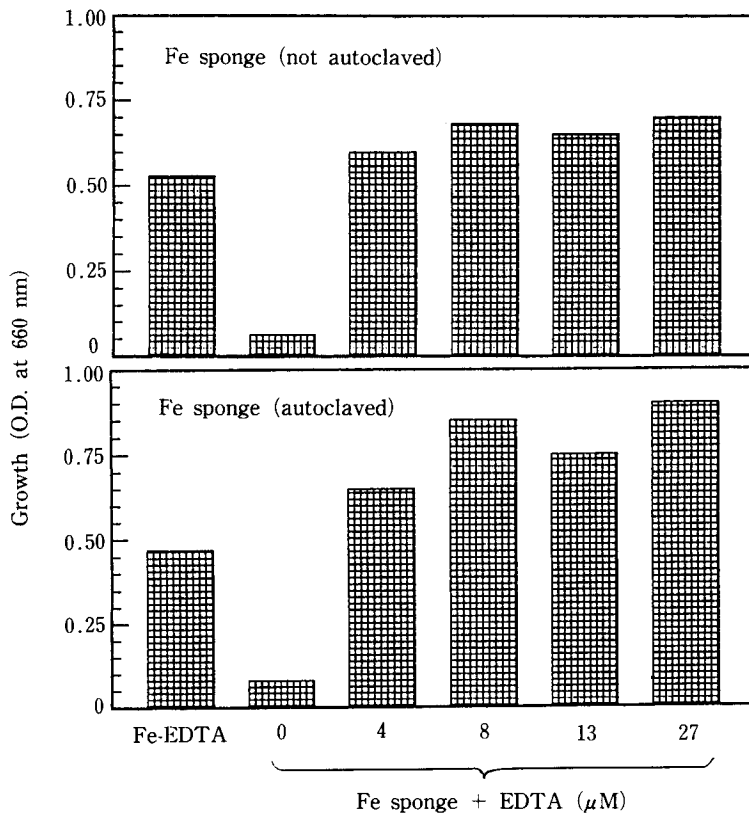


Fig. 7. Effect of spongy iron and EDTA on the growth of *O. tenuis* (Fe 50mg; 16th day of culture).

Fe(II) への還元機構について検討中である。

## 考 察

かび臭物質産生ラン藻類4種の鉄吸収機構について検討するため、培地中の EDTA を欠乏させ、あるいは鉄源としてスポンジ鉄及び鉄粉を用いて培養実験を行った。著者らが前報<sup>9,10)</sup>で報告したように、培地中に EDTA が存在しない場合（すなわち鉄がコロイド状態で存在する場合）には、低濃度レベルの鉄の存在下においては *A. macrospora*, *P. tenue* 及び *O. tenuis* の琵琶湖産の3種のラン藻は増殖阻害を起こした。本研究ではコロイド鉄（調製後、冷蔵庫内に保存）の添加量を増して、上記3種のラン藻の培養実験を行ったところ、*A. macrospora* と *P. tenue* は比較的良好に増殖したのに対して、*O. tenuis* は増殖阻害を起こした。またコロイド鉄をオートクレーブ処理をした場合には、上記3種のラン藻はいずれも増殖阻害を起こした。さらに、培地に BPDS を添加し、光照射をした実験と併せて考察すると、調製直後のコロイド鉄溶液や調製後、冷蔵庫内に保存したコ

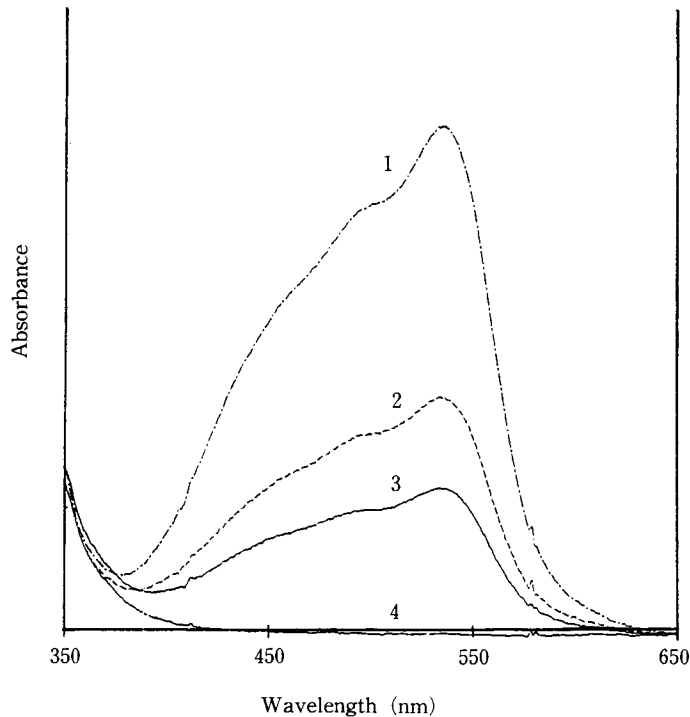


Fig. 8. Photoreduction and microbial reduction of Fe(III) (EDTA chelate) to Fe(II) in the presence of *P. tenue* and BPDS (Bathophenanthroline disulfonate) (2nd day of incubation).

1: Medium containing *P. tenue* (in light); 2: Medium containing *P. tenue* (in dark); 3: Medium (in light); 4: Medium (in dark); Initial cell density of *P. tenue*: 0.027 (O.D. at 660 nm). Light means illumination at 2,000 lux for 16:8 hours (light : dark). Samples 1 and 2 were filtered before measurement.

ロイド鉄溶液の場合には、鉄は幾分反応しやすい形態で存在するため、*A. macrospora* と *P. tenue* は鉄を吸収することができてかなり増殖した。しかし、オートクレーブ処理をすると、コロイド鉄は安定な状態に変化して2価に還元される鉄量が著しく減少するため、*A. macrospora* と *P. tenue* は鉄を吸収できなくなり、増殖阻害を起こすことが判明した。Finden ら<sup>2)</sup> は天然水中の水酸化鉄が光によって還元され、溶解性鉄の連続的な供給源となっていること及び酸化鉄の表面に共沈しているフミン物質がこの還元に関与している可能性を報告している。上記の実験結果から天然水中のコロイド鉄も溶解性鉄の供給源となっていることが考えられる。しかし、著者らの実験結果から明らかなように、コロイド鉄はその安定状態によりラン藻が利用できる鉄量はかなり制限されるため、溶解性鉄の供給源にはなりえても、藻類の異常増殖を支えるのに十分な鉄供給源にはなりにくいように思われる。今後天然水を用いてさらにこの点について検討する必要があると考えられる。

次に、Fe(II)を連続的に供給するシステムとして、鉄源としてスポンジ鉄と鉄粉を用いて、上記ラン藻の培養実験を行った。その結果、*A. macrospora*、*P. tenue* 及びノルウェー産の *O. brevis* はよく増殖できるのに対して、*O. tenuis* は増殖阻害を起こした。*O. tenuis* の場合、スポンジ鉄を鉄源として用いても EDTA を添加すれば効率よく鉄を利用できるため良好な増殖が認められ、EDTA などのキレート剤の添加が必要であることが判明した。

また培地に添加した Fe(III)-EDTA の Fe(II) への還元は光照射によるだけでなく、ラン藻類の細胞の働きによっても引き起こされることが見いだされた。

こうしてラン藻の培養実験に広く使用されている CT 培地に添加されているキレート剤 EDTA は沈殿しやすい鉄をキレートとして溶存状態に保つと共に、EDTA の存在はラン藻による鉄の吸収形態である 2 価鉄を連続的に供給して、生育に必須な鉄の吸収性を高めることにより、その増殖を促進する作用があることが判明した。

さらに *A. macrospora* や *P. tenue* のように光照射のもと（あるいはラン藻の細胞の作用により）で 2 価に還元される鉄が存在すれば（その量に依存するが）キレート剤が存在しなくても、鉄を吸収できる種がある一方で、*O. tenuis* のようにキレート状態の鉄（しかも光照射下や細胞の作用により 2 価に還元される鉄）が存在しない場合にはその増殖が劣る種があることが明らかになった。

これまでの著者らの研究で明らかになった、4 種のかび臭物質産生ラン藻類すなわちノルウェー産の *O. brevis*、琵琶湖産の *O. tenuis*、*A. macrospora*、*P. tenue* の鉄吸収の相違をまとめて Table 1 に示す。表に示されるように、*O. brevis* は通常の CT 培地に含まれる Fe-EDTA のもとではもちろんのこと、コロイド鉄及び熱力学的にさらに安定な酸化鉄 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) までも利用できる、Fe(II)-BPDS を鉄源として利用することができる<sup>11-13</sup>、スポンジ鉄や鉄粉を利用できるなどの点で、最も優れた鉄吸収機能を持っていることが判明した。特に、本種がコロイド鉄や安定な酸化鉄を鉄源として効率よく利用できる能力はきわめて興味深く、シデロフォアなどを分泌して鉄を溶解、吸収している可能性が示唆され、現在その機構を検討中である。一方、*O. tenuis* は鉄利用の面からは最も劣っていることが示唆された。本種は藻糸当り高い濃度のかび臭物質 MIB を産生するが、これまで琵琶湖においては *A. macrospora* や *P. tenue* ほど増殖しないことが報告されており<sup>1,4,14</sup>、その理由はまだ明らかでないが、こうした鉄吸収機能の差違もその要因の一つかもしれない。

前報<sup>9-13</sup> 並びに今回の結果から、藻類種により利用できる鉄の形態が異なること並びに同一のラン藻でも鉄の形態によりその吸収機構が異なることが判明した。著者らのこれまでの研究結果と今回の実験で得られたかび臭物質産生ラン藻類による鉄吸収に関する知見は、ラン藻の増殖並びにかび臭物質の産生に関して今後さらに詳細に検討する場合に役立つと推察される。またこれらの藻類種はかび臭物質を産生するラン藻の鉄吸収を研究する上に、さらに広く生物の鉄吸収機構を理解する上にきわめて有用であると考えられる。なかでも様々な形態の鉄を利用できる *O. brevis* は鉄吸収の面における生物の多彩な機能を研究するための優れた材料になると考えられる。鉄はリンや窒素と共に天然の水圏生態系においてかび臭物質産生ラン藻の増殖制限要因の一つに成ることが考えられ、そのためこ

Table 1. Growth response of musty-odor producing cyanobacteria to various forms of iron.

Cyanobacteria	Fe(III)	Fe(II)	Iron colloid			Iron oxide
	-EDTA	-BPDS	(A)	(B)	(C)	(Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )
<i>A. macrospora</i>	Yes*	No	No	Yes	No	No
<i>O. tenuis</i>	Yes	No	No	No	No	No
<i>P. tenue</i>	Yes	Yes	No	Yes	No	No
<i>O. brevis</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Cyanobacteria	Fe(III)	Iron	Iron	Iron sponge (powder)
	-DESF	sponge	powder	+ EDTA
<i>A. macrospora</i>	No	Yes	Yes	Yes
<i>O. tenuis</i>	No	No	No	Yes
<i>P. tenue</i>	No	Yes	Yes	Yes
<i>O. brevis</i>	Yes	Yes	Yes	Yes

(A): Not autoclaved, low levels of iron; (B): Not autoclaved, high levels of iron; (C): autoclaved, high levels of iron; \* "Yes" means good growth. BPDS: Bathophenanthroline disulfonate; DESF: Desferrioxamine B; *A. macrospora* and *O. brevis* produce geosmin, and *O. tenuis* and *P. tenue* produce MIB (2-methylisoborneol).

これらのラン藻の鉄吸収機構を理解することが自然界におけるラン藻の増殖やかび臭物質産生機構を解明し、さらにラン藻の発生の予測や抑制、あるいはラン藻と微生物や他の藻類との競合や相互作用を解明するのに役立つものと考えられる。

## 摘 要

かび臭物質産生ラン藻類の鉄吸収機構を明らかにするため、琵琶湖産の *A. macrospora*, *P. tenue*, *O. tenuis* 及びノルウエー産の *O. brevis* の4種のラン藻を用いて、培地に EDTA などのキレート剤が存在しない場合を主体に培養実験を行って検討した。

培地中に EDTA が存在しない場合 (鉄がコロイド状態で存在), 1  $\mu$ M レベルの低い鉄の存在下では, *A. macrospora*, *P. tenue*, *O. tenuis* の琵琶湖産の3種のラン藻は鉄を吸収できず殖阻害を起こしたが, コロイド鉄 (調製直後, あるいは調製後冷蔵庫内に保存) の添加量を増すと, *A. macrospora* と *P. tenue* は比較的良好に増殖したが, *O. tenuis* は増殖阻害を起こした。コロイド鉄をオートクレーブ処理するとコロイド鉄は安定な状態に変化し, 琵琶湖産の上記3種のラン藻はいずれも増殖阻害を起こした。また培地に添加した Fe(III)-EDTA の Fe(II) への還元は照射だけでなく, ラン藻の細胞の働きによっても起こることが判明した。BPDS を添加して実験を行った結果と併せて考察すると, 照射によりあるいはラン藻の細胞の作用により2価に還元される鉄の存在量がラン藻の増殖を左右することが判明した。さらに Fe(II) を連続的に供給するシステムとして, スポンジ鉄と鉄粉を鉄源に用いて, 上記のラン藻の培養実験を行った。その結果, *A. macrospora*, *P. tenue* 及び *O. brevis* はよく増殖したが, *O. tenuis* は増殖阻害を起こした。

以上の結果から, かび臭物質産生ラン藻類は照射あるいはラン藻の細胞の作用により, 2価に還元される鉄量が十分にあればキレート剤 EDTA が存在しなくても, *A. ma-*

*crospora*, *P. tenue*, *O. brevis* は鉄を吸収し増殖できることが明らかになった。しかし *O. tenuis* はキレート化した鉄で、しかも光照射あるいはラン藻の細胞により2価に還元される有機態の鉄が必要であることが判明した。こうして前報<sup>9-12)</sup>と今回の結果から、鉄吸収の機能面においてノルウェー産の *O. brevis* はきわめて幅広い環境変化に適応しており、今回の実験で検討した4種のかび臭物質産生ラン藻類の中で最も優れていると考えられるのに対し、*O. tenuis* が最も劣っていることが示唆された。

## 引用文献

1. 犬塚享司・保尊とし子・服部和夫. 1988. カビ臭原因生物 *Oscillatoria tenuis* Agardh の増殖特性について. 用水と廃水, 30 : 864-871.
2. Finden, D.A.S., Tipping, E., Jaworski, G.H.M. and Reynolds, C.S. 1984. Light-induced reduction of natural iron (III) oxide and its relevance to phytoplankton. Nature (London). 309 : 783-785.
3. Hill-Cottingham, D. G. 1955. Photosensitivity of iron chelates. Nature (London). 175 : 347-348.
4. 保尊とし子・犬塚享司・服部和夫. 1989. カビ臭原因生物 *Oscillatoria tenuis* Agardh の増殖特性について. II. AGP 試験による増殖特性の検討. 用水と廃水, 31 : 798-803.
5. Keberle, H. 1964. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. Ann. N. Y. Acad. Sci. 119 : 758-768.
6. Naes, H., Aarnes, H., Utkilen, H. C., Nilsen, S. and Skulberg, O. M. 1985. Effect of photon fluence rate and specific growth rate on geosmin production of the cyanobacterium *Oscillatoria brevis* (Kutz.) Gom. Appl. Environ. Microbiol. 49 : 1538-1540.
7. 中島進・八木正一. 1990. *Anabaena macrospora* のジオスミン産生と生物窒素固定能に及ぼす環境要因の影響. 日本水処理生物学会誌. 26 (2) : 36-43.
8. 中島進・八木正一. 1990. *Oscillatoria tenuis* の増殖と2-メチルイソボルネオール産生に及ぼす微量金属の影響. 日本水処理生物学会誌. 26 (2) : 44-55.
9. 中島進・八木正一. 1990. *Oscillatoria tenuis* の増殖とMIB産生に必要な鉄の形態についての検討. 日本水処理生物学会誌. 26 (2) : 56-60.
10. 中島進・八木正一. 1990. *Anabaena macrospora* と *Phormidium tenue* の増殖とかび臭物質産生に必要な鉄の形態. 日本水処理生物学会誌. 26 (2) : 61-67.
11. 中島進・八木正一. 1991. ラン藻類 *Oscillatoria brevis*, *Anabaena macrospora*, *Phormidium tenue* 及び *Oscillatoria tenuis* の増殖とかび臭物質産生に必要な鉄の形態. 農学研究. 62 (4) : 253-270.
12. Nakashima, S. and Yagi, M. 1991. Iron forms influencing the growth and musty odor production of cyanobacteria. Abstracts of Third International Symposium on Off-Flavors in the Aquatic Environment (1991年3月, 於ロサンゼルス). p. 15.
13. Nakashima, S. and Yagi, M. 1992. Iron forms that influence the growth and musty odor production of selected cyanobacteria. Water Sci. Technol. (印刷中).
14. 根来健・西川光春・岡山治一・安藤政義. 1987. *Oscillatoria tenuis* による琵琶湖南湖のカビ臭. 用水と廃水. 29 (7) : 3-9.
15. Watanabe, M. M. and Ichimura, T. 1977. Fresh and salt-water forms of *Spirulina platensis* in

- axenic cultures. Bull. Jap. Soc. Phycol. 25 : Suppl. (Mem. Iss. Yamada), 371-377.
16. Yagi, M., Kajino, M., Matsuo, U., Ashitani, K., Kita, T. and Nakamura, T. 1983. Odor problems in Lake Biwa. Water Sci. Technol. 15 : 311-321.
17. Yagi, M. 1988. Musty odour problems in Lake Biwa 1982-1987. Water Sci. Technol. 20 : 133-142.
18. 八木正一. 1988. 琵琶湖かび臭の原因生物の現況. 日本水処理生物学会誌. 24 : 28-36.
19. 八木正一. 1989. 植物性プランクトンによる異臭の実態. 用水と廃水. 31 : 859-868.
20. Yagi, M. and Nakashima, S. 1989. A study of standards for musty odour compounds in drinking water in Japan. Water Supply. 7 : 153-160.

## Absorption of Iron by Musty-Odor Producing Cyanobacteria (*Anabaena macrospora*, *Phormidium tenue*, *Oscillatoria tenuis* and *Oscillatoria brevis*)

Susumu NAKASHIMA, Isao AOYAMA and Masakazu YAGI

### Summary

A recent problem for water utilities is musty-odor, which is caused by geosmin or 2-methylisoborneol produced by cyanobacteria.

In order to clarify the mechanism of growth of musty-odor producing cyanobacteria, the effect of iron on the growth of *Anabaena macrospora*, *Phormidium tenue*, *Oscillatoria tenuis* and *Oscillatoria brevis* was studied.

The growth of *A. macrospora*, *P. tenue* and *O. tenuis* was suppressed at low levels of iron (colloidal iron, 1  $\mu$ M as Fe) in the EDTA-free CT medium. However, at high levels of iron (18  $\mu$ M as Fe) using colloidal iron kept in a refrigerator, *A. macrospora* and *P. tenue* were able to grow although *O. tenuis* could not. When autoclaved colloidal iron was used as the iron source, none of the cyanobacteria except *O. brevis* were able to grow.

The effect of spongy or powdery iron on the growth of cyanobacteria was also investigated. *A. macrospora*, *P. tenue* and *O. brevis* were capable of growing in media containing spongy or powdery iron, which release Fe(II) continuously, but the growth of *O. tenuis* was suppressed.

The culture experiments and photoreduction of Fe(III) to Fe(II) show that *A. macrospora*, *P. tenue* and *O. brevis* can utilize iron even in the absence of EDTA if there are large amounts of iron present in a form photoreducible to Fe(II). However, *O. tenuis* was found to require chelated and photoreducible iron for its

growth.

The present results and previous studies {Nogaku Kenkyu, 62:253-270(1991)} indicate that *O. brevis* has the ability to utilize a wide variety of iron forms such as Fe(III)-EDTA, Fe(II)-BPDS, Fe(III)-Desferrioxamine B (microbial siderophore) chelates, colloidal iron, iron oxides ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), spongy iron and powdery iron. On the other hand, *O. tenuis* seems to have very specific requirements for the form of iron it can utilize for growth.